

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-265023

⑤ Int. Cl.

A 61 K 31/35

識別記号

ADY
ACR
AFE

庁内整理番号

7375-4C

④ 公開 平成1年(1989)10月23日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑤ 発明の名称 下痢症ウイルス感染阻害剤

② 特 願 昭63-91155

② 出 願 昭63(1988)4月13日

⑫ 発 明 者	阪 中	専 二	三重県四日市市赤堀新町9番5号	太陽化学株式会社内
⑫ 発 明 者	八 田	一	三重県四日市市赤堀新町9番5号	太陽化学株式会社内
⑫ 発 明 者	海 老 名	卓 三 郎	宮城県仙台市広瀬町2丁目12番地	
⑫ 発 明 者	西 本	勝 也	三重県四日市市赤堀新町9番5号	太陽化学株式会社内
⑫ 発 明 者	金	武 祐	三重県四日市市赤堀新町9番5号	太陽化学株式会社内
⑫ 発 明 者	山 本	武 彦	三重県四日市市赤堀新町9番5号	太陽化学株式会社内
⑫ 発 明 者	山 崎	長 孝	三重県四日市市赤堀新町9番5号	太陽化学株式会社内
⑦ 出 願 人	太陽化学株式会社		三重県四日市市赤堀新町9番5号	

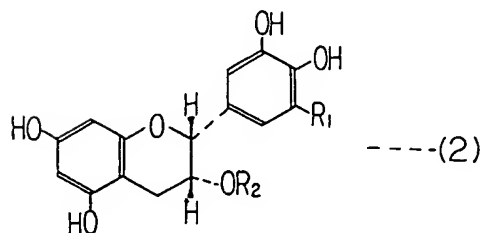
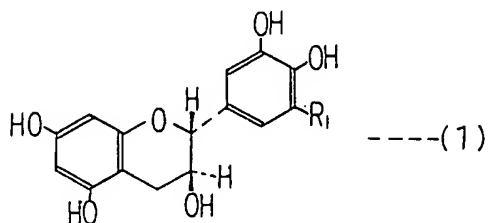
明細書

1. 発明の名称

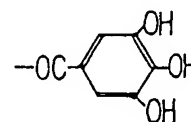
下痢症ウイルス感染阻害剤

2. 特許請求の範囲

(1). 一般式(1)及び(2)



(式中R₁は水素原子またはヒドロキシル基を示し、R₂は水素原子または3,4,5-トリヒドロキシベンゾイル基



を示す)

で表されるポリフェノール化合物を有効成分とする下痢症ウイルス感染阻害剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は下痢症ウイルス感染阻害剤に関する。

(従来の技術)

急性ウイルス性胃腸炎(下痢症)は、ごくありふれた疾患であるが、その原因ウイルスが分離、同定されたのはごく最近であり、治療剤の開発も研究の途についたばかりである。これまでウイルス性下痢症の原因ウイルスとして、ロタウイルス、ノルオウクウイルス、カリシウイルス、アスト

特開平1-265023(2)

ロウイルス、腸性アデノウイルス、コロナウイルス及びブレダウイルス等が検出されている。それらの中でもロタウイルスは世界中に広く分布しマウスからヒトに至るほとんどの哺乳類及び鳥類に感染し、乳幼児、幼若動物で下痢症を顕性発症する。しかも世界的には発展途上国を主として年間数百万～一千万と推定される乳幼児が下痢症で死亡しており、その多くがロタウイルスによることが判明している。従って、病原ウイルスであるロタウイルスの制圧を目指して、これまで数多くの抗生物質やワクチンの開発が進められてきた。しかし、いまだ有効な抗生物質は見い出されておらず、またワクチンに関しても罹患者が乳幼児及び幼若動物であることから、生ワクチンの投与試験においてもまったく無効であることが報告されている(De Mol, P. et al; Lancet. II: 108, 1986, 海老名卓三郎; 医学のあゆみ. 140, 32, 1987)。

畜産業界においても、仔牛のロタウイルスによる下痢症は、仔牛の死亡、あるいは成長の遅れ等

の原因となり、大きな問題である。これに対する各種の予防法が試みられているが、抗生物質等の使用は、食肉への残留など解決すべき点が多めであり今だ完全克服に至っていない。

(発明が解決しようとする問題点)

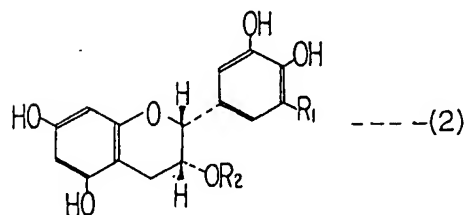
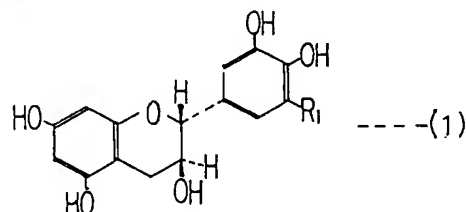
上記現状から、下痢症ウイルスの感染を効果的に阻害し、主な対象である乳幼児、幼動物への投与が容易かつ長期投与が可能で、残留等の問題がなく、しかも安価に大量製造が可能な下痢症ウイルス感染阻害剤の開発が望まれている。

(問題点を解決するための手段)

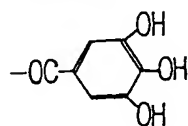
本発明者らは、ウイルス性下痢症の原因ウイルスに対して高い抗ウイルス作用を示し、かつ長期の連用に於て安全性の高い物質を探すべく鋭意研究を重ねた結果、ツバキ科の植物、特に我々が日常飲用に供している茶(*Camellia sinensis*, (L.) O. Kuntze)に含まれるポリフェノール化合物が優れた下痢症ウイルス感染阻害活性を有し、しかも極めて毒性が低いことを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、

一般式(1)及び(2)



(式中 R₁ は水素原子またはヒドロキシル基を示し、R₂ は水素原子または3, 4, 5-トリヒドロキシベンゾイル基



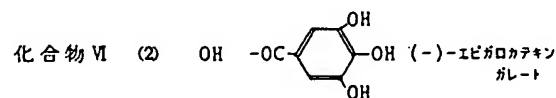
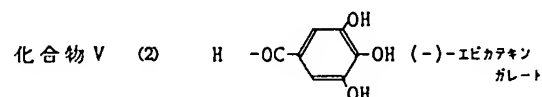
を示す)

で表されるポリフェノール化合物を有効成分とする下痢症ウイルス感染阻害剤である。

本発明のポリフェノール化合物とは、一般式(1)及び(2)で表される第1表に示した6種類のカテキン類緑体化合物をさす。

第1表

	式	R ₁	R ₂	一般名
化合物 I	(1)	H	H	(+)-カテキン
化合物 II	(2)	H	H	(-)-エピカテキン
化合物 III	(1)	OH	H	(+)-ガロカテキン
化合物 IV	(2)	OH	H	(-)-エピガロカテキン



特開平1-265023(3)

本発明のポリフェノール化合物は、茶の水もしくは水溶性有機溶媒抽出物の酢酸エチル可溶画分より得ることができるが、他の原料起源のもの及び化学合成品でもさしつかえない。

本発明のポリフェノール化合物の典型的調製法を例示すると次のようである。

まず茶を充分量の水、含水アセトンもしくは含水アルコールで抽出する。抽出後、公知の方法にて残渣を分離し抽出液を得る。抽出液から溶媒を留去し、その残留物に水を加え溶解後ヘキサン、クロロホルム及び酢酸エチルを順次用いて分配を行い、ヘキサン可溶画分、クロロホルム可溶画分及び酢酸エチル可溶画分を得る。本操作におけるヘキサン及びクロロホルムによる分配は、茶抽出液の着色度及び粘度等の状況により省略することができるが、酢酸エチル可溶画分の純度を上げるためには、ヘキサン及びクロロホルムによる分配の実施が望ましい。

抽出に用いるアルコールは、メチルアルコール、エチルアルコール、n-プロピルアルコール

、イソプロピルアルコール、ブチルアルコール等の低級アルコールが操作性・抽出効果の点から好ましい。

さらに上記で得られた酢酸エチル可溶画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルム-メタノール(20:1, V/V)及びクロロホルム-メタノール(10:1, V/V)の溶媒にて順次溶出することにより第1表の6種化合物を得ることができる。また必要に応じて、さらにセファデックスLH-20に付し、適当な溶媒例えばメタノールにて溶出することにより、あるいはリサイクルHPLC(日本分析工業製、LC-908, GS-320カラム, 溶媒メタノール)を用いることにより、より高純度の第1表の6種化合物を得ることができる。

(作用)

本発明の下痢症ウイルス感染阻害剤の阻害対象となるウイルスは、ロタウイルス、ノルオウウイルス、カリシウイルス、アストロウイルス、腸性アデノウイルス、コロナウイルス及びブレダウ

ウイルス等であるが、本発明の阻害剤の有効成分であるポリフェノール化合物は、これらウイルスに直接作用して不活化する直接作用を有すると共にウイルスが標的細胞に結合するのを防ぐ作用を持つと推測される。

以下、試験例により詳述する。

(試験例1)

緑茶の熱水抽出物の酢酸エチル可溶画分(第1表に示すポリフェノール化合物の混合物として純度74.1%)を $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度となるように生理食塩水に溶解し、ヒトロタウイルスWa株(血清型1) 1.5×10^4 FCFU/ ml と1時間、 37°C で反応させた後、MA104細胞に感染させ、20時間後のFCFU(蛍光抗体陽性フォーカス単位)測定により対照と比較して感染阻止率(%)を算定した。

結果は第2表に示すように用量依存的に感染が阻止された。

第2表 緑茶抽出物の酢酸エチル可溶画分

濃度 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.5	1	2
FCFU値	44.1 36.7 40.4 40.8	22.1 23.5 20.7 24.1	1.9 3.4 3.5 2.7
平均	40.5 ± 3.03	22.6 ± 1.52	2.9 ± 0.74
阻止率(%)	32.7	62.5	95.2

(ウイルスコントロールは平均 $60.2(\pm 5.64)$)

(試験例2)

第1表に示した化合物VIを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度となるように生理食塩水に溶解し、ヒトロタウイルスWa株(血清型1) 1.5×10^4 FCFU/ ml と1時間、 37°C で反応させた後、MA104細胞に感染させ、20時間後のFCFU測定により対照と比較して感染阻止率(%)を算定した。

結果は第3表に示すように用量依存的に感染が阻止された。

特開平1-265023(4)

第3表 化合物VI

濃度 $\mu\text{g/ml}$	0.1	0.5	1
F C F U 値	27.4	17.8	1.8
	24.4	17.8	2.4
	32.4	19.6	3.6
	30.0	22.0	1.4
平 均	28.6 ± 5.1	19.3 ± 1.98	2.3 ± 0.95
阻止率(%)	52.6	68.0	96.2

(ウイルスコントロールは平均60.2(± 5.64))

(試験例3)

第1表記載の化合物Vを(実験例2)の化合物VIと同様に試験した結果、第4表に示すように用量依存的に感染が阻止された。

第4表 化合物V

濃度 $\mu\text{g/ml}$	0.1	0.5	1
F C F U 値	46.0	30.4	8.0
	52.2	26.8	9.6
	49.0	28.8	10.4
	40.2	31.8	9.6
平 均	46.85 ± 5.1	29.45 ± 2.15	9.4 ± 1.0
阻止率(%)	22.2	51.1	84.4

(ウイルスコントロールは平均60.2(± 5.64))

(試験例5)

急性毒性実験

ddy系マウスを1群10匹として、各群に生理食塩水に懸濁したポリフェノール化合物(試験例1に記載の化合物)を恒温($23 \pm 1^\circ$)、恒湿($55 \pm 5\%$)の条件下で経口投与しリッチフィールド・ウィルコックス(Litchfield-Wilcoxon)法によりLD₅₀を求めた結果、雌で3.1g/Kg、雄で5g/Kg以上であった。

(試験例6)

細胞毒性試験

MA104細胞(サル腎細胞)を、 1.2×10^5 cell/tubeになるように10% FCS含有BHK cell培地(抗生物質無添加)に添加した。それに第1表に示したポリフェノール化合物を5 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 及び0.5 $\mu\text{g/ml}$ になるように添加し、37°Cで4日間培養し、細胞増殖を調べた。その結果、増殖曲線は生理食塩水だけを加えたコントロールと同様で

(試験例4)

緑茶の熱水抽出物の酢酸エチル可溶画分(第1表記載のポリフェノール化合物の混合物として純度74.1%)を生理食塩水に溶解し、その100 μl を生後5日目BALB/Cマウスに経口的に与えた。5分から10分後に、同マウスに対しヒトロタウイルスWa株、Kun株、Mo株それぞれの 1.0×10^5 FCFUを含むウイルス液100 μl で経口感染させ、攻撃試験を行った。その後毎日、下痢発生の有無を5日間観察し、下痢発生率により(下痢マウス匹数/試験マウス匹数)で結果を評価した。対照は、生理食塩水100 μl を与えたマウスに同様攻撃試験を行った。

第5表

試験No.	経口投与サンプル	下痢発生率
1	対 照	10/10
2	0.5 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	0/10
3	0.1 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	0/10
4	0.05 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	1/10
5	0.01 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	3/10

あり細胞毒性は全く認められなかった。

次に、本発明を応用例により詳しく説明するがこれにより本発明を限定するものではない。

応用例1. 乳幼児用粉乳

市販調製粉乳 100 重量部
第1表記載の化合物V 0.0001

100.0001

上記配合を常法に従い混合する。

応用例2. 家畜幼動物用代用乳

全脂粉乳 26 重量部
脱脂粉乳 40
カゼイン 9
牛 脂 5
ヤシ油 1
乳 糖 18
ビタミン・ミネラルミックス 1
第1表記載の化合物VI 0.00005

100.00005

特開平1-265023(5)

上記配合を常法に従い混合する。

応用例3. 飲料組成物

ブドウ糖	4.8	重量部
果糖	0.776	
粉末クエン酸	0.144	
クエン酸ナトリウム	0.102	
乳酸カルシウム	0.012	
塩化マグネシウム	0.012	
粉末天然香料	0.120	
ビタミンC	0.0018	

第1表記載の化合物

I ~ VI の混合物	0.0001
-------------	--------

〔発明の効果〕

本発明の有効成分であるポリフェノール化合物は、急性ウイルス性胃腸炎（下痢症）の原因ウイルスに対し強い感染阻害作用を示す。しかも、極少量で有効性を示す本成分は古来より飲用に供されている茶の成分であることからその安全性は極めて高く、下痢症ウイルス感染阻害剤を大量に供給することが可能であり、開発途上国における下痢症による乳幼児死亡の撲滅に貢献することは勿論産業的にも極めて有用であると考えられる。

特許出願人

太陽化学株式会社

水を加えて100重量部とする。

本発明品は経口による投与により、その効果を発現し得るものであり、乳幼児、幼動物の飲料水、餌料に添加し使用することができる。添加する本来のポリフェノール化合物の量は使用態様によっても異なるが、通常有効量である0.1μg/Kg体重以上となる様に投与するのが望ましい。